

## Universelles Verfahren zur Isolierung von DNA aus beliebigen Ausgangsmaterialien

**Publication number:** JP2002531126 (T)

**Publication date:** 2002-09-24

**Inventor(s):**

**Applicant(s):**

**Classification:**
















- international: C12N15/00; C07H21/00; C07H21/04; C12N15/10; C12Q1/68; C12N15/00; C07H21/00; C12N15/10; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/00; C12Q1/68

- European: C12N15/10A2; C12N15/10A3

**Application number:** JP20000586897T 19990723

**Priority number(s):** DE19981056064 19981204; WO1999DE02248 19990723

### Also published as:

	DE19856064 (A1)
	DE19856064 (C2)
	US2001041332 (A1)
	US6699987 (B2)
	RU2241004 (C2)
	NO20012700 (A)
	EP1135479 (A1)
	EP1135479 (B1)
	DK1135479 (T3)
	WO0034463 (A1)
	CN1332798 (A)
	CA2352472 (A1)
	AU6186299 (A)
	AU771681 (B2)
	AT230022 (T)

<< less

Abstract not available for JP 2002531126 (T)

Abstract of corresponding document: **DE 19856064 (A1)**

The invention relates to formulations without chaotropic components for isolating nucleic acids, notably DNA from any quantity of any complex starting material, by bonding to a solid phase. The formulations contain a lysis/bonding buffer system presenting at least one antichaotropic salt component, a solid phase and known washing and elution buffers. The lysis/bonding buffer system can be an aqueous solution or a solid formulation in ready-to-use reaction vessels. As the solid phase any support materials are suitable which are used for isolation by means of chaotropic reagents, such as, preferably, glass-fibre matting, glass membranes, silicon supports, ceramic materials, zeolites or materials having negatively functionalized surfaces or chemically modified surfaces which can be given a negative charge potential.; The invention further relates to a method for isolating nucleic acids, notably DNA, from any complex starting materials by using the formulations provided for in the invention. Said method is characterized by the following: lysis of the starting material, bonding of the nucleic acids to a support material, washing of the nucleic acids bound to said support and elution of the nucleic acids.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-531126

(P2002-531126A)

(43)公表日 平成14年9月24日(2002.9.24)

(51)Int.Cl. <sup>1</sup>	識別記号	PI	チーエムコード(参考)
C12N 15/00		C12Q 1/68	A 4B063
C12Q 1/68		C12N 15/00	Z

検査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 44 頁)

(21)出願番号 特願2000-586897(P2000-586897)  
 (86)(22)出願日 平成11年7月23日(1999.7.23)  
 (85)翻訳文提出日 平成13年8月4日(2001.8.4)  
 (86)国際出願番号 PCT/DE99/02248  
 (87)国際公開番号 WO00/34463  
 (87)国際公開日 平成12年6月15日(2000.6.15)  
 (31)優先権主張番号 198 56 064.8  
 (32)優先日 平成10年12月4日(1998.12.4)  
 (33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 インビテック ゲーエムベーハー  
 ドイツ連邦共和国 デーラー13125 ベル  
 リン、ロバート・ロッセル・シュトラッセ  
 10  
 (72)発明者 ヒレブランド、ティモ  
 ドイツ連邦共和国 デーラー12619 ベル  
 リン、バンシナー シュトラッセ 60  
 (72)発明者 ベンズゴ、ピーター  
 ドイツ連邦共和国 デーラー12623 ベル  
 リン、イッブランド・シュトラッセ 32  
 (74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)  
 Fターム(参考) 4B063 Q413 Q403 Q442 Q432 Q450  
 Q456 Q484 Q534 Q502

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 任意の複合的出発物質からの核酸の単離、ならびにその後の複合的遺伝子解析のための製剤および方法

(57)【要約】

本発明は、任意の量のあらゆる複合的出発材料から、核酸、特にDNAを、固相に結合させることにより単離するための、カオトロピック性化合物を含有しない製剤に関する。該製剤は、少なくとも1種の抗カオトロピック塩成分を含有する溶解/結合バッファー系、固相、ならびに公知の洗浄および溶出バッファーを含む。溶解/結合バッファー系は、水溶液、またはすぐに使用できる反応容器内に入った固形製剤であって良い。固相としては、カオトロピック性試薬による単離に用いられるあらゆる支持体材料が適しており、好ましくは、ガラス繊維マット、ガラス膜、シリコン支持体、セラミック材料、沸石、または負電荷の官能性表面もしくは潜在的に負電荷を帯びるように化学的に修飾された表面を持つ材料などである。本発明はさらに、本発明で提供される製剤を使用して、あらゆる複合的出発材料から核酸、特にDNAを単離する方法に関する。上記方法は、出発材料の溶解、支持体物質への核酸の結合、上記支持体に結合した核酸の洗浄、および該核酸の溶出を、特徴とする。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 任意の複合的出発材料から、核酸、特にDNAを固相に結合させて単離するための製剤であって、

少なくとも1種の抗カオトロピック塩成分を含む溶解/結合バッファー系、

固相、

公知の洗浄および溶出バッファー、

を含み、カオトロピック成分を含まない上記製剤。

【請求項2】 抗カオトロピック成分がアンモニウム塩、セシウム塩、ナトリウム塩、および/またはカリウム塩、好ましくは塩化アンモニウムである、請求項1記載の製剤。

【請求項3】 溶解/結合バッファー系が、必要に応じて界面活性剤および添加物を含む、請求項1または2に記載の製剤。

【請求項4】 界面活性剤および添加物が、Tris-HCl、EDTA、ポリビニルピロリドン、CTAB、TritonX-100、N-ラウリルサルコシン、クエン酸ナトリウム、DTT、SDS、および/またはTweenである、請求項3記載の製剤。

【請求項5】 溶解/結合バッファー系が固相への結合のためのアルコールを含有する、請求項1~4のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項6】 溶解/結合バッファー系が酵素、好ましくはタンパク質分解酵素を含有する、請求項1~5のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項7】 溶解/結合バッファー系が水溶液である、請求項1~6のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項8】 溶解/結合バッファー系がすぐに使用できる反応槽内で安定して保存できる固形製剤である、請求項1~6のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項9】 カオトロピック試薬、好ましくはガラス繊維マット、ガラス膜、ガラス、沸石、セラミック、シリカ担体を用いる単離に使用するあらゆる担体を固相として利用する、請求項1~8のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項10】 負電荷官能性表面または潜在的に負電荷に転換しうる官能性表面を有するあらゆる担体を固相として利用する、請求項1~8のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項11】 担体の表面がアセチル基、カルボキシル基、または水酸基で修飾されている請求項10記載の製剤。

【請求項12】 任意の複合的出発材料から、請求項1～9のいずれか1項に記載の製剤を用いて、核酸、特にDNAを単離する方法であって、  
出発材料を溶解し、  
固相に核酸を結合させ、  
担体に結合した核酸を洗浄し、そして核酸の溶出を行うこと、  
を含む上記方法。

【請求項13】 DNAを含む材料を、  
抗カオトロピック塩成分を含み、少なくとも1種の界面活性剤を含み、必要に応じて添加物、さらに必要に応じてタンパク質分解酵素を含む水溶液を含有する溶解/結合バッファー系を用いて、  
必要に応じてアルコールを添加して、固相と接触させ、  
その後洗浄して、核酸を固相から解離させる、  
ことを含む、請求項12に記載の核酸を単離する方法。

【請求項14】 出発材料が、果実、種子、葉、針葉などの小型の植物材料、全血、組織、微小生検試料、パラフィンコートをした材料、内視鏡的逆行性胆道膵管造影サンプル、スワップサンプルなどの臨床関連サンプル、魚類、ソーセージ、缶詰、ミルクなどの食料品、毛根、たばこの吸い殻、血痕などの法医学的サンプル、およびDNAを含有する他のサンプルである、請求項13記載の方法。

【請求項15】 溶解/結合用の抗カオトロピック塩のイオン強度が0.1～8Mである請求項12～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】 請求項1～8、10および11のいずれか1項に記載の製剤を用いて任意の複合的出発材料から、核酸、特にDNAを単離する方法であって、  
出発材料を、化学的に改変した「単一試験管」法、または1ステップ法において、負電荷官能性表面または潜在的に負電荷に転換しうる官能性表面と接触させて、溶解させ、

該表面に核酸を結合させ、  
結合した核酸を洗浄し、そして必要に応じて溶出する、  
ことを含む、上記方法。

【請求項17】 負電荷官能性表面が、適当に修飾された平面表面、フィルター膜、従来のプラスチック槽または微量試験プレートである、請求項16記載の方法。

【請求項18】 請求項16および17のいずれか1項に記載の方法であって、続いて、核酸を同一の反応バッチ内で選択された配列部分の増幅反応に供し、必要に応じて、そこで遺伝子配列を解析することを含む上記方法。

【請求項19】 請求項16および17のいずれか1項に記載の方法であって、続いて、同一の反応バッチで核酸をハイブリダイズさせること、および/または配列決定することを含む上記方法。

【請求項20】 固相に結合している核酸を単離および精製するための、溶解/結合バッファー系中での抗カオトロピック成分の使用。

【請求項21】 抗カオトロピック成分がアンモニウム塩、セシウム塩、ナトリウム塩、および/またはカリウム塩、好ましくは塩化アンモニウムである、請求項20記載の使用。

【請求項22】 イオン強度が0.1~8Mである抗カオトロピック塩を溶解/結合に使用する、請求項20または21記載の使用。

【請求項23】 溶解/結合バッファー系を水溶液の形で使用する、請求項20~22のいずれか1項に記載の使用。

【請求項24】 溶解/結合バッファー系が安定して保存できる安定な製剤として存在する、請求項20~22のいずれか1項に記載の使用。

【請求項25】 遺伝子治療への使用を目的とするDNAを調製するための単離および精製における、請求項20~24のいずれか1項に記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明の主題は、カオトロピック成分を含まず、少なくとも1種の抗カオトロピック塩成分を含む溶解/結合バッファー系、固相、ならびに公知の洗浄および溶出バッファーを含む、任意の複合の出発材料および任意の量から核酸、特にDNAを固相に結合させて単離するための製剤である。溶解/結合バッファー系は、水溶液として、またはすぐに使用できる反応槽に入った固形製剤として存在して良い。カオトロピック試薬を用いる単離に適用される全ての担体、好ましくはガラス繊維マット、ガラス膜、シリコン担体、セラミックス、沸石、または負電荷官能性である表面または潜在的に負電荷に変換しうる化学的に修飾された表面を有する材料は、固相として利用できる。

## 【0002】

さらに、本発明の主題は、出発物質の溶解、担体への核酸の結合、担体に結合した核酸の洗浄および核酸の溶出を特徴とし、それに続いて場合によっては選択された配列部分の増幅、および必要ならば続いて同一反応容器内における増幅された遺伝子断片の解析を伴う、本発明の製剤を用いる任意の複合の出発材料から核酸、特にDNAを単離する方法である。本方法の適用分野は、法医学、食品分析、医学的診断、分子生物学、生化学、遺伝子工学、およびその他の隣接領域などのDNAの単離を取り扱うあらゆる研究である。

## 【0003】

古典的な条件によると、強い変性条件および還元条件下で、一部ではタンパク質分解酵素も使用して、核酸を含む出発材料を分解し、フェノール/クロロホルム抽出ステップにおいて分離される核酸画分を精製し、透析またはエクノール沈殿によって該水相から核酸を取り出すことにより、細胞および組織からDNAを単離する(Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; およびManiatis, T., 1989, CSH, [Molecular Cloning])。

## 【0004】

細胞、ならびに特に組織から核酸を単離する「古典的な方法」は、非常に時間がかかり(48時間以上かかる場合もある)、器具に非常に費用がかかり、またその

他、現場条件下で実行できない。さらに、このような方法は、少なからず健康に対する危険のある化学物質であるフェノールおよびクロロホルムを使用する必要がある。

種々の生物学的出発材料から核酸を単離するための多数の上記方法に代わる方法は、核酸の高価で健康を害するフェノール/クロロホルム抽出を回避でき、かつ時間の消費を低減できる。

#### 【0005】

これらの方法の全ては、VogelsteinおよびGillespie (Proc.Natl.Acad.Sc.USA, 1979, 76, 615-619)により開発されたアガロースゲルからDNA断片を調製および分析のために精製するための方法に基づいている。該方法は、カオトロピック塩 (NaJ) の飽和溶液中でガラス粒子にDNAを結合させてDNAを単離するためにDNAのバンドを含有するアガロースを溶解することと組み合わせられている。ガラス粒子上に固定されたDNAは、その後、洗浄溶液(20 mM Tris HCl[pH 7.2]; 200 mM NaCl; 2 mM EDTA; 50% v/v エタノール)で洗浄し、そして、担体粒子から解離する。

今日まで、この方法は何度が改変され、今でも、様々な起源の核酸の抽出および精製のさまざまな方法に適用されている(Marko, M.A.; Chipperfield, R. およびBirnboim, H.G.; 1982, Anal. Biochem., 121, 382-387)。

#### 【0006】

さらに、今日、主にアガロースゲル中のDNA断片を精製するための、および細菌溶菌液からプラスミドDNAを単離するための、さらに、血液、組織、またはさらに細胞培養物から、長鎖の核酸(ゲノムDNA、細胞性全RNA)を単離するための試薬システムも世界中に多数存在している。

#### 【0007】

これらの市販のキットの全ては、種々のカオトロピック塩の溶液の存在下で無機質担体に核酸が結合するという周知の原理に基づいており、担体として細かく粉砕したガラスパウダー(例えば、glass milk、BIO 101、La Jolla, CA)、珪藻土(シグマ社)またはシリカゲル(Diagen、DE 41 39 664 A1)の懸濁液を用いる。

#### 【0008】

多数の異なる用途にとって実用的な核酸の単離方法は、米国特許第5,234,809号(Boom)に示されている。該特許においては、出発材料をカオトロピックバッファーおよびDNAに結合する固相とインキュベートすることにより、核酸を含む出発材料から核酸を単離する方法が記載されている。カオトロピックバッファーが、出発材料の溶解、ならびに固相への核酸の結合をもたらす。該方法は、少量の材料からの核酸の単離に非常に適しており、実際に特にウイルス核酸の単離の分野で適用されている。

#### 【0009】

かかる方法の特定の改変は、特定の態様における適用において利点を示す新規の担体の使用に関する(Invitek GmbH 国際公開公報第WO-A 95/34569号)。

#### 【0010】

しかし、カオトロピックバッファーおよび固相と共に出発材料をインキュベートすることに基づく複合的出発材料からの核酸の単離方法は、カオトロピックバッファーにより起こる細胞の分解は全ての材料に適用できるわけではなく、また、大量の出発材料に対しても多くの時間を消費し、極めて不十分にしか機能しないという事実、およびその他の決定的な欠点がある。その他にも、例えば、DNAを組織サンプルから単離しなければならない場合、機械による均質化法が必要である。さらに、異なる態様の研究には、濃度の異なる異種のカオトロピックバッファーをその都度用いなければならない。従って、該方法を広範に適応できるわけではない。

#### 【0011】

おそらく出発材料の溶解が困難であるために起こる問題は、核酸単離用(特に、複合的出発材料からのゲノムDNAの単離用)の多くの市販品によって解決できるが、出発材料の溶解がタンパク質分解酵素を含む通常のバッファー中で行われるので、上記米国特許による方法の特徴である従来の「単一試験管」法には当てはまらないという大きな欠点を有する。その後の例えば遠心分離膜などへの核酸の結合に必要なカオトロピックイオンは、溶解を完了した後に溶解バッチに別途添加しなければならない。しかしながら、カオトロピック塩のタンパク質破壊作用は公知であり、もちろん効果的な溶解に必要なタンパク質分解酵素を迅速に破壊



すると考えられるので、カオトロピックイオンを溶解バッファの一部とすることは不可能である。

#### 【0012】

このような理由により、カオトロピック塩を用いて核酸を単離する方法は、多くの欠点にも関わらず世界中で受け入れられ、市販品によって極めて頻繁に使用されてきた。これらのシステムは、適用が極めて単純で、出発材料の溶解、そして、担体懸濁液の、遠心用カラム内にあるガラスまたはシリカ膜の固相への核酸の結合、結合した核酸の洗浄、続いてイオン強度の極めて弱いバッファを用いる核酸の溶出という原理に常に従っている。

#### 【0013】

これらのシステムの全ては、カオトロピック塩、即ちカオトロピック塩を主要成分として含有する少なくとも1種のバッファ溶液の存在下で、それぞれの担体表面に核酸を結合させることに基づいている。これは、多分、すでに溶解バッファ、またはタンパク質分解酵素を含むシステムの場合は出発材料の溶解が完了した後に添加する所望の結合バッファを意味するものである。

#### 【0014】

負電荷を帯びた、中性、または塩基性のタンパク質溶液を塩析するためのホフマイスター(Hofmeister)系列は、カオトロピック塩の基本をなす。したがって、カオトロピック塩は、タンパク質を変性させること、水中で非極性物質の溶解度を増大させること、および、疎水性相互作用を破壊することの特徴とする。従来技術によれば、カオトロピック塩のバッファ系を用いる場合においても、これらの性質により、水性溶媒の高次構造を破壊し、それによって核酸の選択された固相への結合がもたらされる。核酸の単離に最も重要な試薬は、過塩素酸ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、チオシアン酸グアニジン、および塩酸グアニジンである。しかし、これらは高価であり、また一部は毒性または腐食性がある。

#### 【0015】

今日にまでの膨大な数の特許出願および権利化された特許が、このような従来技術に基づいており、それらにおける上記方法の改変は全て、新規の担体または

より効率的な洗浄バッファーなどに関するものであり、シリカ材料からなる固相に結合するためにカオトロピック塩を常に使用するという基本原理を用いている。

#### 【0016】

カオトロピック塩の存在下における無機質担体への核酸の結合の物理化学的原理は、国際的な専門家の間では認知されているようである。無機質担体の表面への核酸の結合は、核酸が無機質材料、特にガラスまたはシリカ粒子の表面に吸着する際に通過する水性溶媒の高次構造の攪乱に起因する。水性溶媒の高次構造の攪乱は、常にカオトロピックイオンの存在を必要とする。カオトロピック塩が高濃度の場合、その反応はほぼ定量的に進行する。これらの物理化学的な見解が公表されることによって、専門家は、全ての核酸単離用の市販のシステムは、核酸が核酸結合用の固相に結合するためには、高イオン強度のカオトロピック塩を含むバッファー成分を有していなければならないという事実に至る。

#### 【0017】

溶解/結合バッファー系に抗カオトロピック塩を含む製剤が、任意の出発材料、特に複合的出発材料からの核酸の単離に同等にまたはより一層適しているという本発明の見解はより驚くべきことである。

#### 【0018】

本発明は特許請求の範囲にしたがって実施する。したがって、本発明の主題は、任意の複合的出発材料から核酸、特にDNAを固相に結合させて単離するための、カオトロピック成分を含まず、少なくとも1種の抗カオトロピック塩成分を含む溶解/結合バッファー系、固相ならびに公知の洗浄および溶出バッファーを含む製剤および方法である。本発明における抗カオトロピック成分は、アンモニウム塩、セシウム塩、ナトリウム塩、および/またはカリウム塩、好ましくは塩化アンモニウムである。

#### 【0019】

さらに、上記溶解/バッファー系は、例えばTris-HCl、EDTA、ポリビニルピロリドン、CTAB、Triton X-100、N-ラウリルサルコシン、クエン酸ナトリウム、DTT、SDS、およびまたはTweenなどの公知の界面活性剤および添加物を含む。好ま

しい実施形態においては、溶解/結合バッファー系が、固相への結合のために、エタノール、イソプロパノールなどのアルコール、および場合によっては酵素（好ましくは、プロテイナーゼのようなタンパク質分解性酵素）を含む。

#### 【0020】

本発明とともに、従来技術に関する原理を用いて、核酸の単離の特有の問題を解決でき、または、特定の関連する要素については既存の改変を最適化および効率化できる。従って、完全自動化ハイスループット法としての適用に好適である。

#### 【0021】

全く予期しなかったことに、従来技術とは異なり、本発明にしたがって、カオトロピック塩成分を含まない溶解/結合バッファー系を用いて、核酸、特にゲノムDNAを無機質支持試薬に結合させることができ、また通常の条件下で溶出できる。

#### 【0022】

さらに、必要に応じて、通常の溶解/結合バッファー系の成分として全く異種の複数の塩が、ガラスまたはシリカを基礎とする従来の担体に核酸を結合させるには十分であることを述べた。

#### 【0023】

本発明者らが特に驚いたことは、化学物理的性質によるとこれまで核酸の結合に用いられているカオトロピック塩とは正反対の効果を示す塩を用いると、最良の結果が得られることである。従って、発明者らは、これらの塩を抗カオトロピックと呼ぶ。

#### 【0024】

以上のことより、カオトロピック塩（市販の抽出キット）の代わりにアンモニウム塩などを主成分とする溶解/結合バッファーを用い、他の反応成分および担体は従来から用いていたものを変更せずに、かつ全く同様の所定の反応過程のままで、種々の複合的出発材料（例えば、血液、組織、植物）からのゲノムDNAの抽出において、定量的および定性的に少なくとも同等の結果を得ることができた。

#### 【0025】

従って、アンモニウムイオンは、顯著に、ホフマイスター系列の既知のカオトロピックイオンとは全く反対の化学物理的な関連する性質を示す該系列のイオンである。

#### 【0026】

単に、溶解/結合バッファー中の従来より使用されているカオトロピック塩成分を抗カオトロピック塩成分に置換するだけで、他の全ての要素は変えずに、公知の固相担体の表面上で、少なくとも十分に定量的な核酸の単離が可能である。

#### 【0027】

このことは、同様の方法で、タンパク質を変性するのではなく安定化させる塩により、複合的出発材料からも核酸を単離でき、精製して通常の適用に対して供給できることを意味する。かかる塩は、非極性物質の水中での溶解度を増大ではなく減少させ、疎水性相互作用を破壊するのではなく強化する。

#### 【0028】

本発明により、固相担体、好ましくは無機質担体に核酸を結合させるための新規の代替的な機構、およびそれに基づく、複合的出発材料から核酸を単離する広範に適用可能な新規の方法が提供される。

#### 【0029】

従って、本発明は、通常のシリカまたはガラス材料からなる種々の固相への核酸の結合に基づいて、核酸、特にゲノムDNAを単離するための、カオトロピック塩に基づく溶解/結合バッファーの新規な成分の使用による、個々の試験用キット（製剤）の必須成分として代替できる化学作用の使用を可能とする。

#### 【0030】

以上のことから、抗カオトロピック塩を用いる本発明の方法は、公知の実験室での日常の作業で核酸を単離する工程手順に従う。そして、該方法は：

1. 出発材料の溶解
  2. 固相への核酸の結合（遠心分離用カラムまたは懸濁液）
  3. 結合した核酸の洗浄
  4. 公知の低塩濃度バッファーによる核酸の溶出
- を特徴とする。

## 【0031】

本発明は、任意の出発材料、および必要に応じて複合の出発材料からの核酸、特にゲノムDNAの高効率かつ迅速な単離を可能にする。結合に必要な抗カオトロピックイオンは、タンパク質分解酵素を含む場合でも、溶解/結合バッファの成分としてよい。したがって、本発明の方法は容易にかつ広範に適用できる。

## 【0032】

任意の出発材料からの核酸、特にDNAの単離は、カオトロピック物質を用いることなく、核酸を含む出発材料をインキュベーションすることにより達成され、該核酸は、

- 抗カオトロピック塩成分、少なくとも界面活性剤、必要に応じて、添加物、さらに必要に応じて酵素、を含有する水溶液を含む溶解/結合バッファ系
  - および、任意の固相、好ましくはガラス繊維マット、ガラス膜、ガラス、沸石、セラミック、および他のシリカ担体
- と接触することとなり、出発材料の溶解およびそれに続く固相へのDNAの結合が起こる。続いて、結合した核酸を、公知の方法により洗浄し、固相から解離させる。

## 【0033】

特定の抽出手法の場合、さらなる界面活性剤、アルコール、または界面活性剤/アルコール混合物を必要に応じて溶解バッチに添加してもよい。

## 【0034】

好ましい出発材料は、果実、種子、葉、針葉などの小型の植物材料、全血、組織、微小生検試料、パラフィンコートをした材料、内視鏡的逆行性胆道膵管造影サンプル、スワップサンプルなどの臨床関連サンプル、魚類、ソーセージ、缶詰、ミルクなどの食料品、毛根、たばこの吸い殻、血痕などの法医学的サンプル、およびDNAを含有する他のサンプルである。

## 【0035】

本発明において好ましいイオンは、ホフマイスター系列中に示される、抗カオトロピックのアンモニウムイオン、セシウムイオン、およびカリウムイオン、ならびにナトリウムイオン、またはこれらの組み合わせであり、より好ましくは塩

化アンモニウムである。これらのイオンは、溶解/結合においては0.1~8Mのイオン強度で用いる。

#### 【0036】

核酸、特にDNAを固相担体に結合させるためには、好ましくは $\leq 1M$ の低濃度の上記の塩で十分であるが、特定の適用においては、 $\leq 0.5M$ の濃度でも好ましく、より大量の出発材料からの核酸の定量的な単離を達成するには、より高イオン濃度がよい。

#### 【0037】

溶解バッファの必須成分としてタンパク質安定化作用を有する抗カオトロピック塩を使用することにより、本発明の好ましい実施形態において、溶解プロセスを補助し、より効率的にするために、プロテイナーゼKなどのタンパク質分解酵素を添加することも可能であり、さらにまた、所望する細胞の分解のために、例えば5Mなどの高イオン強度の抗カオトロピック塩を添加することにより、核酸の定量的単離が可能となる。

#### 【0038】

公知のカオトロピック塩を用いる従来技術のバッファ系は、一般に核酸の定量的な単離に必要な所望どおりの高イオン強度でタンパク質分解酵素を含有することは不可能である。従って、常に、固相に核酸を結合させるために、後から該塩を添加しなければならない。

#### 【0039】

本発明の溶解バッファ/結合バッファにおける界面活性剤は、陰イオン性、陽イオン性、または中性の界面活性剤、SDS、Triton X-100、TweenまたはCTABなどを用いることが好ましい。

#### 【0040】

出発材料の溶解を完了した後、必要に応じて、短時間の遠心分離ステップでその懸濁液を完全に溶解されていない成分から分離し、直ぐにDNA結合性材料とインキュベートするか、または、上述のしたように、さらなる界面活性剤、アルコールもしくは界面活性剤/アルコール混合物を添加した後に固相とインキュベートする。溶解バッファ系には、概して、極めて低濃度( $< 50mM$ )のEDTAおよび/

またはTris-HClを加えられている。極めて混入の多い出発材料からのDNAの単離には、2~4%のポリビニルピロリドンまたは阻害成分に選択的に結合する他の公知の物質を該バッファー系に添加することが好ましい。

#### 【0041】

例えば、市販品の遠心分離用カラムに入ったガラス繊維マット、様々なサイズの粒子からなるSiO<sub>2</sub>などのシリコン化合物が、単離するDNAの結合材料として際立って優れていることがわかっている。さらに、カオトロピックバッファーを用いる核酸の単離に使用する全ての材料を用いることができる。

#### 【0042】

DNA結合材料とインキュベーションした後、該溶解液を短時間の遠心分離ステップにより結合材料から分離する。続いて、例えば、少なくとも50%のエタノール、および必要であれば低塩濃度(例えばNaClなど)を含む洗浄バッファーで周知の方法で洗浄し、担体を乾燥させ、結合したDNAを、好ましくは50℃~70℃で、周知の低塩濃度バッファー(Tris-HCl; TE; 水)により溶出する。

#### 【0043】

本発明に適用するさらなる改変は、例えば、小型組織サンプル、毛根などの分解し難い出発材料を溶解するため、または溶解の効率を最適化して溶解に必要な時間を低減するために、タンパク質分解酵素、好ましくはプロテイナーゼKなどのプロテイナーゼを添加することである。

#### 【0044】

従って、本発明は、溶解バッファー混合物中の必須成分である抗カオトロピック塩を、従来から用いられている担体の全て、および同等に効果的に使用されているそれらの改変物、ならびに同等に有用であり従来から適用されている核酸の規定とおりの単離と新規に組み合わせて、DNAを含有するあらゆる出発材料ならびに任意の量の極めて多種多様な出発材料から核酸、特にDNAを単離するための、広範な適用可能な方法に適用できる。

#### 【0045】

本発明の方法による適用の最も一般的な改変においては、従来技術に匹敵する、あらゆる選択された複合的出発材料からの核酸の抽出を、首尾良く、極めて容

易にかつ非常に迅速に実施できる。即ち、新規の普遍的なバッファー系、高効率の溶解およびその後の核酸の無機質担体への結合により、小型の植物材料(果実、種子、葉、針葉など)、臨床関連サンプル(全血、組織、微小生検試料、パラフィンコートをした材料、内視鏡的逆行性胆道膵管造影サンプル、スワップサンプルなど)、食料品(魚類、ソーセージ、缶詰、ミルクなど)、法医学的サンプル(毛根、たばこの吸い殻、血痕など)、ならびに他の出発材料からの核酸の抽出を、首尾良く、極めて容易にかつ非常に迅速に実施できる。

#### 【0046】

該方法のさらなる利点は、極めて少量の出発材料からDNAが高効率で単離できること(例えば、全血  $1\mu\text{l}$ 、毛根、 $1\text{mg}$ 以下の微小生検試料からのDNAの単離)、ならびに、例えば、 $50\text{ml}$ の全血、 $1\text{g}$ の組織材料、 $<1\text{g}$ の植物材料など、非常に大量の出発材料からも高効率でDNAを単離できることである。

#### 【0047】

さらに、カオトロピック塩を抗カオトロピック塩に置換する利点は、用いるバッファーが、全く毒性または腐食作用がないことであり、これらの利点はカオトロピック薬剤には欠落している。

#### 【0048】

最も一般的な実施の改変とは別に、特定の適応に係る抽出方法の最適化は、出発サンプルに含まれるDNA量のほぼ定量的な単離を可能とする。従来技術によるDNA結合のための高濃度のカオトロピックイオンを用いない本発明の方法によって、市販品の極めて優れた(hightly optimized)抽出キットにより従来から可能であった方法よりも高いDNA収量が得られることは驚くべきことである。

#### 【0049】

市販品の抽出キットにより得られたそれぞれの比較結果を選択して、実施例に示す。これらの結果は、本発明の可能性を明確に示している。

#### 【0050】

DNAを含むあらゆる複合的出発材料からのDNAの単離とは別に、本発明の方法に適用するさらなる改変は、従来技術においてプラスミドDNAを無機質担体に結合させるために必要であったカオトロピック塩を用いずに、細菌の溶菌液からのプ



ラスミドDNAの高効率での単離を可能とする。従って、当技術分野の熟練者に周知の基本的な溶解によりプラスミドDNAを単離する工程ステップによると、いわゆる中和反応が必要であり、それを従来の溶液III(solution III、ManiatisおよびSambroek)を用いて行う。この場合、この溶液IIIは2官能性であり、同時に通常の固相担体へのプラスミドDNAの結合ももたらす。従って、通常行うカオトロピックのグアニジン塩酸の添加は、該プラスミドDNAの結合には必要ない。

#### 【0051】

結合したプラスミドDNAも公知の方法で洗浄して、担体から溶出する。該方法は、あらゆる量(ミリからギガまで)の用いる出発材料からのプラスミドDNAの単離に適している。従って、得られるプラスミドDNAの収量は、従来の市販品による方法により単離される収量と同等である。しかし、カオトロピック塩が非常に高価であるため、本発明の方法は他の全ての公知の系より経費において極めて好適である。

#### 【0052】

従って、抗カオトロピック塩を用いる方法は、経費/調製が選択の決定的な基準となる場合、プラスミドを単離するための自動化システムを設計するのに極めて好適であることがわかる。本発明の製剤は、驚くべき方法で、核酸の単離および診断の分野における、さらなるかなり興味深い新規な適用への利用を可能にする。

#### 【0053】

本発明の適用のさらなる形態においては、少なくとも1つの抗カオトロピック塩成分を含む本発明の新規の溶解/結合バッファー系が、負電荷を帯びている表面または潜在的に負電荷をもつ表面を有する固相に核酸を結合させる役割を果たす。

#### 【0054】

達成される核酸の化学修飾された固相への結合による核酸を精製するための方法および手段は、従来技術により公知となっている(米国特許第5,523,392号:ケイ酸アルミニウムおよびリン酸シリケート(Phosphosilicate)上でのDNAの精製; 米国特許第5,503,816号:DNA精製用のケイ酸化合物; 米国特許第5,674,997号:改

変されたケイ酸上でのDNAの精製；米国特許第5,438,127号：PCl<sub>3</sub>で改変されたガラス繊維膜を用いる固相抽出によるDNAの精製；米国特許第5,606,046号：trifluorimetric acidで洗浄したガラス繊維膜を用いる固相抽出によるDNA精製；米国特許：予めトリフルオロ酢酸、さらにフッ素イオン、水酸化イオン、またはBCl<sub>3</sub>で処理しておいたガラス繊維膜を用いる固相抽出によるDNA精製；米国特許第5,610,291号；DNA吸着体として調製するためにSiCl<sub>3</sub>、AlCl<sub>3</sub>、またはBCl<sub>3</sub>で処理し、NaOHで洗浄することにより改変したガラス繊維膜；米国特許第5,616,701号；水酸化物で洗浄したガラス繊維膜を用いる固相抽出によるDNA精製；米国特許第5,650,506号：固相抽出によるDNA精製に有用な改変ガラス繊維膜）。

#### 【0055】

この場合、核酸のこのような結合の必須条件は、常に、結合に用いる膜が化学修飾反応により陽イオン電荷を帯びていることである。従って、用いる膜の正に荷電した表面と核酸のリン酸結合の陰イオン電荷の間のクーロンの相互作用により結合が起こることは明らかである。従って、正に荷電した固相に核酸を結合させる原理は、当業者には公知であり、これまで長年にわたり、例えば、正に荷電したナイロンフィルター上へDNA/RNAをブロッティングする技法（当業者であれば熟知している）などにおける標準的な適用であったことが理解される。

#### 【0056】

しかし、上述のこの方法の完全に本質的な欠点は、核酸の単離に適していないことである。即ち、複合的出発材料からの核酸の単離は全く不可能である。上記の米国特許明細書に示されている公知の方法で単離されるべき出発材料は、常にすでに単離された核酸である。その場合、特にある態様は当業者にとって明らかではないと思われる。記載の結合条件（生理的バッファー条件下での結合）と溶出条件は同一である。正に荷電した膜への核酸の結合と同様のバッファー条件下でどのようにして核酸を再度膜から分離できるのかは明らかになっていない。

#### 【0057】

最後に、上記の手法およびそれぞれの方法は、実際には非常に狭い方法でしか適用できない。合成して作製したオリゴヌクレオチドが陽性表面に結合することも周知である。これは逆に、クーロンの相互作用を用いることにより、即ち、正

電荷と負電荷の結合に基づいて、例えば、修飾したオリゴヌクレオチド(アミノリンカーまたはリン酸リンカーとの結合)を介して、達成される。これらの改変も、核酸の複合的出発材料からの単離を可能とはしない。

#### 【0058】

詳細に上述したとおり、十分な正電荷を帯びた精製用の膜に対する核酸の結合の別の形態があるが、核酸を単離する方法には向かない。核酸の結合は、膜の陽イオン電荷と核酸骨格の陰イオン電荷の間での相互作用に基づくクーロン力によりもたらされる。従って、この原理は論理的に説明可能であろう。

#### 【0059】

本発明の抗カオトロピック塩を用いる複合的出発材料からの核酸の単離に基づいて、驚くべき現象が検出された。これにより、負電荷を帯びた表面または潜在的に負電荷に転換されうる表面もまた、本発明の溶解/結合バッファー系を用いる核酸結合に適していることが明らかになった。一般に、同じ電荷電位によって、結合ではなく反発が起こるといような可能性は考えられなかった。

#### 【0060】

本発明の負電荷官能性表面または潜在的に負電荷に改変された表面は、周知の方法で作成される。例えば、アセチル基、カルボキシル基、または水酸基の反応層の表面への光化学的カップリングは、好適であることが証明されている。

#### 【0061】

本発明における改変により、複雑な核酸の解析に対する新しい展望が完全に開かれた。つまり、上述の全ての改変におけるような陰性または潜在的に陰性の表面への結合において、核酸はすでに単離されている必要はないということが明らかになった。結合は、溶解反応バッチにおいて起こり、即ち、核酸を含む出発サンプルが溶解され、放出される核酸が負に荷電した表面(例えば、微量試験用プレート穴またはエッペンドルフ(Eppendorf)反応管)に結合する。

#### 【0062】

本発明における改変は、完全に新規な「単一試験管」法及び1ステップ法に適用し、複合的出発材料からの核酸の単離を可能とする。かかる方法は、実施者に対して、その適用範囲内において多大な利点をもたらす(単純さ、経済性、廃棄

物の減少、迅速性、日常の使用に対する適応性、自動化可能性など)。

#### 【0063】

さらに、この改変の更なる適用は、反応容器内で核酸を抽出することだけでなく、必要に応じて、これに続く標的の増幅およびその後の分析をも同一反応容器内で可能にする。必要ならば、固相上でのハイブリダイゼーション反応または配列決定も可能にする。

#### 【0064】

上述に基づき、例えば0.5mlのエッペンドルフPCR管などを、当業者には周知の技術により、負に荷電した官能基または潜在的に負に荷電した官能基により修飾する。アセチル基、カルボキシル基、または水酸基の反応容器の表面との光化学的カップリングは、該修飾に好適な例である。その後、核酸を単離するために選択したサンプル(例えば、全血)を該反応容器の中に入れ、例えば塩化アンモニウム、界面活性剤、およびタンパク質分解酵素を加えた、抗カオトロピック塩画分を含有する溶解バッファーと共にインキュベートし、該容器を70℃で5分間インキュベートする。

#### 【0065】

最大限に核酸を結合させるため、界面活性剤/アルコール混合物を、出発材料の溶解が完了した後にピペッティングしてもよい。次いで、該パッチを短時間インキュベートした後、反応容器の液体を捨てる。ここで核酸は、反応容器の官能性表面に結合しており、続いて、アルコール性の洗浄バッファーで短時間洗浄して、例えば70℃でインキュベーションすることにより、アルコールを除去する。さらに、結合した核酸の溶出は、慣例の方法によって、低塩濃度のバッファー(例えば、10mM Tris-HCl)を該反応容器に加えて、例えば70℃で短時間(例えば、2分間)インキュベーションすることにより達成される。

#### 【0066】

上記に示したように、複合的出発材料からの核酸の単離の全反応が1つの反応容器内で進行し、即ち出発材料の溶解、核酸の結合、結合した核酸の洗浄、および核酸の溶出は、1つの反応容器内を用いてその中で達成される。

#### 【0067】

現在、世界中で最も良く適用されているQiagen社の抽出用キットは、溶解、結合、洗浄、および溶出において、常に1つのフィルターカートリッジと少なくとも4つの別々の反応容器を必要とし、さらに複数の遠心分離ステップを含む。

#### 【0068】

これとは対照的に、本発明における改変は、1回も遠心分離ステップを必要とせずに核酸の抽出を可能とする。このことより、時間的にも非常に大きな利点が生まれる。これらの利点は、Boomにより記載されている米国特許第5,234,809号に述べられている核酸抽出法にも関する。

#### 【0069】

しかし、核酸の抽出の可能性とは別に、結合した核酸を上記の0.5mlの反応容器の表面に残したまま、例えば、その後に、完全なPCR混合物(プライマー、ヌクレオチド、ポリメラーゼバッファー、Taqポリメラーゼ、マグネシウム)を添加することにより、PCRの適用に直接利用してもよい。即ち、この場合、抽出と増幅が同一の反応容器内で進行する。

#### 【0070】

これらの例は、本発明により得られる多大な利点および広範な適用可能性を示すものである。ある改変では、サンプルの調製の全工程を、必要であれば増幅、そして解析も含めて、例えば1つの反応容器内で実施できる。従って、修飾した反応容器(または他の固相表面でも可)および適切な溶解/結合バッファーを準備することで、混入のあるサンプルの問題を抱えている分子生物学および主に核酸診断を扱う研究室において、新しい標準的手法が開発され、それによって、混入のあるサンプルの問題は、適応の新規の潜在的解決法により顕著に低減することが明らかである。

#### 【0071】

更なる利点、および更なる適用も、表面上に固定された核酸は、少なくとも長時間、安定して固定されたまま保持されるので、後の処理に利用できる状態にあり、即ちPCRを抽出の後すぐに行わなくても良い。更なる適用分野は、場合によっては、本明細書中に記載の負に荷電したまたは潜在的に負電荷を帯びた表面(好ましくは、適切な反応容器、例えば微量試験用プレートなどの、プラスチック

表面)を用いる、完全に自動化した核酸抽出および解析である。

#### 【0072】

抗カオトロピック塩を主成分として含有し、必要であればタンパク質分解酵素を含む、本発明の溶解/結合バッファー系は、固形製剤としても提供されうる。この目的のためには、塩および界面活性剤からなり、必要に応じて添加物ならびに酵素を含む混合物を、通常の実験槽に分注して、95℃で数時間インキュベートするか、または公知の方法にしたがって凍結乾燥すると、固形製剤になる。

#### 【0073】

この核酸単離用の調製済みの複合的の反応混合物である固形製剤は、長期間安定であり、即ち、タンパク質分解酵素成分の生物学的活性も、長期の保存期間保持される(実施例を参照のこと)。従って、溶解バッファー混合物の安定な製剤は、公知の保護用添加物を添加することなく、低温凍結乾燥により簡便に調製される。

#### 【0074】

市販品として提供される核酸抽出用の試験用キットはすべて、必要な成分を別々に含んでおり、特定の溶液だけは使用者が調製しなければならない。さらに他には、これらの溶液の安定性は限界がある。更なる欠点は、使用者が、現在の慣用的試験用キットを用いて核酸を単離する際に、様々な個々の溶液について複数のピペティングステップを考慮しなければならないことにある。このことにより、特に医学的診断の分野では、混入の危険性が極度に増大する。さらに、例えば核酸の単離に主として適用される広範に慣用されている遠心分離用カラムの装填には制限があるため、出発材料の量も厳しく制限されるという不利な点がある。この不利な点は、抽出に必要な溶解および結合バッファーを出発材料にさらに加えなければならないことによる。

#### 【0075】

安定に保存できる抗カオトロピック塩に基づく溶解混合物としての安定性のある製剤を提供することにより、現存する問題は、全く簡単に解決される。かかる製剤は、以下の利点：

1. 即時使用できる溶解バッファー混合物の長期保存性、

2. 調整済み溶解用混合物中での長期保存における、タンパク分解酵素の安定性、
3. 用いる遠心分離用カラムの許容量に等しい量に当たる、より大量の出発材料の使用(例えば、その開始量の3倍など)、
4. ピペッティングステップおよび溶液を減らすことによる、混入の危険性の低減
5. 実験室外でも調整済み溶解混合物中にサンプルを入れて、必要に応じて長期保存できること
6. サンプルの輸送および冷却の安定性を有する。

#### 【0076】

調整済みの固形で安定性があり、必要に応じてタンパク質分解酵素を含む多数の様々な成分からなるこの溶解バッファー混合物は、単離する核酸を含有するサンプルを添加するだけで反応が開始するので、(特殊な知識のない人でも)扱いが容易である。これとは別に、さらに付け加えると、該混合物は、その中に含まれる物質によっては保存可能期間が少なくとも6ヶ月はあり、室温でのサンプルの輸送も全く問題ないということもある。

#### 【0077】

該固形製剤の利点は、サンプル材料中に含まれる核酸の溶解には、安定して保存できる該溶解バッファーを含有する反応容器内に、核酸を含むサンプルを入れるだけで、必要ならば水を添加することにより、サンプルはそれぞれの反応容器内で溶解されるということに基づいている。混入を引き起こし、経費のかかる複数のピペッティングステップは完全に減る。所与の現場条件下で臨床サンプルおよび法医学的サンプルを回収し調製することに関する周知の問題は、本発明の製剤により解決され、取り扱いの容易な製剤を利用できる。

#### 【0078】

驚くべきことに、通常の適用によって、溶解する出発材料の添加後、または必要に応じて水を加えた固体サンプルを加えると、該固形製剤は問題なく標準的反応条件を示す液体に再び戻りうることが示された。

## 【0079】

上記をまとめると、以下のとおりである：

本発明の主題は、核酸、特に任意の複合の出発材料のDNAを固相に結合させて単離するための、カオトロピック成分を含まない製剤中の抗カオトロピック塩の使用である。該製剤は、少なくとも1種の抗カオトロピック塩成分を含有する溶解/結合バッファー系、周知の固相ならびに洗浄および溶出バッファーを含む。該溶解/結合バッファー系は、水溶液として利用可能であり、またはすぐに使用できる反応容器内に入った固形製剤としても利用可能でありうる。単離用カオトロピック試薬に用いられる全ての担体を固相として利用でき、ガラス繊維マット、ガラス膜、シリコン担体、またはエアロザイルまたは負に荷電した表面または潜在的に負電荷を帯びた化学的に修飾された表面を有する担体が好ましい。

## 【0080】

さらに、本発明の主題は、出発材料を溶解し、担体に核酸を結合させ、担体に結合した核酸を洗浄し、そして核酸を溶出することを特徴とする上記製剤を用いる、任意の複合の出発材料からの核酸、特にDNAを単離する方法である。

## 【0081】

得られるDNAの質に関しても、遺伝子治療において使用するDNAの調製用の単離および精製に好適である。

## 【0082】

安定して保存可能で、かつ、通常の反応容器内に入った即使用できる混合物として利用できる、抗カオトロピック塩に基づく核酸の単離に即使用できる溶解バッファー系の固形製剤も、本発明の主題である。溶解バッファーパッチの固形製剤は、サンプルに加えるだけで活性化し（全血、唾液、細胞懸濁液、血清、血漿、溶液などの液体サンプルの場合）、組織、毛根、固体表面上の血痕、たばこの吸い殻、パラフィン包埋組織などの固体の出発材料の場合は、さらに水を添加することにより活性化し、出発材料の溶解が起こる。出発材料の溶解が完了した後、必要ならば、エタノール溶液またはアルコール/界面活性剤混合物を添加してから、その溶解パッチを公知の方法で、使用する種々の核酸結合性の固相（懸濁物、遠心分離用カラム）と共にインキュベートする。これに続くそれぞれの固相



上への核酸の結合、結合した核酸の洗浄、および最終的な溶出は、従来技術によりすでに記載されているように行う。これらの固形製剤により、主に、核酸の診断の適用の任意の分野における新規の解決手段が得られる。

#### 【0083】

1ステップ法および「単一試験管」法としての本発明の改変は複合的出発材料からの核酸の単離、必要ならば標的の増幅、さらに必要に応じてその後の増幅した核酸断片の解析を可能にするということを、もう一度記しておく。従って、出発材料は、すでに単離された核酸である必要はなく、核酸を含む複合的出発材料でよい。核酸の結合に必要な表面は、負電荷または潜在的に負電荷の官能基を含む。核酸の結合は、負電荷を帯びた核酸を抗カオトロピック塩に由来する負電荷官能性の表面に結合させるのに必要とされるイオンを含む溶解/結合バッファー中で起こる。

#### 【0084】

従って、

1. 複合的出発材料から核酸を単離するための「単一試験管」法、
  2. 核酸を単離し、その後標的を増幅するための「単一試験管」法、
  3. 複合的出発材料から核酸を単離し、その後標的を増幅し、さらに続いて増幅された核酸断片を解析するための「単一試験管」法、
- が実施可能である。

#### 【0085】

このことは、DNAを含む極めて多様な出発材料からの核酸の単離、必要に応じて標的の増幅および解析が、その同一容器内、または必要に応じて一つの同一反応表面上で起こることを意味する。

#### 【0086】

核酸を含む任意の出発材料および任意の量からの、核酸の単離、精製、それに続く核酸の複雑な分子的解析のための、本発明の製剤ならびに核酸を固相に結合させる普遍的な方法は、1つの反応容器中で、サンプルの調製、標的の増幅および解析を可能とする遺伝子解析の総合的全自動システムの開発のための新規のプラットフォーム技術を呈示する。

## 【0087】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

## 【0088】

実施例1 様々な植物材料からのゲノムDNAの単離

出発材料として各50~100mgの植物材料を液体窒素存在下で乳鉢にて粉碎し、続いて、1.5mlのエッペンドルフ管に移す。溶解バッファー(2% CTAB、2% ポリビニルピロリドン、10mM Tris-HCl、20mM EDTA、および1.3M 塩化アンモニウム)を500 $\mu$ l添加し、少なくとも30分間、65℃でインキュベートする。溶解していない構成要素を遠心分離により沈殿させて、その上澄み液をイソプロパノール200 $\mu$ lと混合する。

## 【0089】

ガラス繊維膜を有する遠心分離用カラム(微量遠心用カラム、LIDA社)に上記溶液を移す。12,000rpmで2分間遠心分離する。ろ過液を捨て、洗浄バッファー(50mM NaCl、10mM Tris-HCl、1mM EDTA、70% (v/v)エタノール)で膜を2回洗浄する。

短時間の遠心分離ステップ(12,000rpm、2分)でエタノールを除去した後、溶出バッファー(10mM Tris-HCl、pH 8.7)200 $\mu$ lを添加し、10,000rpmで1分間遠心分離してDNAを溶出する。

## 【0090】

溶出されたDNAは20 $\mu$ lずつアガロースゲルにロードし、エチジウムブロマイドで染色することによって観察する(図1)。

## 【0091】

実施例2 普遍的バッファー系を用いる、多様な出発材料からのゲノムDNAの同時単離

単離に用いるサンプルは以下のとおりである；

1- 凍結全血：50ml、2- 全血：100 $\mu$ l、3- キュウリ：50mg、4- トマト植物の葉：100mg、5- 唾液サンプル：100 $\mu$ l、6- ニワトリ肝臓、冷凍食品：5mg、7- ニワトリ肝臓、冷凍食品：20mg、8- 毛根、9- シチメンチョウサラミ：50mg、10- イチイ植物の針葉：100mg。

## 【0092】

全てのサンプルは、溶解バッファー(2% CTAB、2% ポリビニルピロリドン、10mM Tris-HCl、20mM EDTA、および1.5M 塩化アンモニウム)500 $\mu$ l中で、全ての植物サンプル以外の場合は20 $\mu$ lのプロテイナーゼK(20mg/ml)と共に、65℃でインキュベートする。

## 【0093】

続いて、該溶解液にイソプロパノール200 $\mu$ lを添加し、ガラス繊維膜を有する遠心分離用カラム(微量遠心用カラム、LIDA社)に移す。12,000rpmで2分間遠心分離する。ろ過液を捨て、洗浄バッファー(50mM NaCl、10mM Tris-HCl、1mM EDTA、70%(v/v)エタノール)で膜を2回洗浄する。短時間の遠心分離ステップ(12,000rpm、2分)でエタノールを除去した後、溶出バッファー(10mM Tris-HCl、pH 8.7)を50~200 $\mu$ l添加し、10,000rpmで1分間遠心分離してDNAを溶出する。

## 【0094】

溶出されたDNAは、1/5量ずつアガロースゲルにロードし、エチジウムブロマイドで染色することによって観察する(図2)。

## 【0095】

実施例3 口腔粘膜のスワップサンプルからのゲノムDNAの単離

口腔粘膜のスワップサンプルからのDNAの単離は以下のとおりである。

## 【0096】

溶解バッファー(CTAB、ポリビニルピロリドン、塩化アンモニウム、Tris、EDTA)400 $\mu$ lずつを1.5mlのエッペンドルフ管に移した。スワップサンプル材料を押しつぶし、20 $\mu$ lのプロテイナーゼK(20mg/ml)を該懸濁液に添加した。続いて、そのバッチを70℃で10分間インキュベートした。溶解後、界面活性剤/イソプロパノール混合液200 $\mu$ lを加えて、サンプルを短時間振り混ぜ、続いて、市販の遠心分離用カラム(LIDA社、ガラス繊維膜)に移し、12,000rpmで1分間遠心分離した。エタノールを含有する洗浄バッファー(NaCl、Tris-HCl、EDTA、エタノール)で該カラムを2回洗浄し(12,000rpm、1分間遠心分離)、短時間の遠心分離ステップで膜を乾燥させた。溶出バッファー(10mM Tris-HCl)200 $\mu$ lを添加し、短時間の遠心分離ステップ(10,000rpm、1分)で結合したDNAをフィルター膜から溶出した

## 【0097】

2回の抽出過程により単離されたDNAを $20\mu\text{l}$ ずつ、分析用に0.7% TAEアガロースゲルにロードし、エチジウムブロマイドで染色して分析した(図3)。

## 【0098】

実施例4 全血サンプル( $200\mu\text{l}$ )からのDNAの抽出に関する、本発明の方法とカオトロピック塩存在下での核酸の結合に基づく市販キットによる方法との比較

本発明の方法によるゲノムDNAの単離を、核酸を結合させるためにカオトロピック塩を用いてゲノムDNAを単離するのに用いる市販品として入手可能でかつ従来から適応されている方法による場合と比較した。比較のための方法によるゲノムDNAの抽出は、使用説明書に基づいて実施した。

## 【0099】

本発明の方法によるDNAの単離は、以下のとおりである。

## 【0100】

全血サンプル(EDTAで処理したもの、新鮮血) $200\mu\text{l}$ ずつを $1.5\text{ml}$ のエッペンドルフ管に移す。溶解バッファー(CTAB、ポリビニルピロリドン、塩化アンモニウム、Tris、EDTA) $350\mu\text{l}$ とプロテイナーゼK( $20\text{mg/ml}$ ) $20\mu\text{l}$ を添加し、10分間 $70^\circ\text{C}$ でインキュベートし、出発材料を溶解させた。溶解後、界面活性剤/イソプロパノール混合液 $180\mu\text{l}$ を加え、サンプルを短時間振り混ぜ、続いて、市販の遠心分離用カラム(LIDA社、ガラス繊維膜)に移し、 $12,000\text{rpm}$ で2分間遠心分離した。エタノールを含有する洗浄バッファー( $\text{NaCl}$ 、Tris-HCl、EDTA、エタノール)で該カラムを2回洗浄し( $12,000\text{rpm}$ 、1分間遠心分離)、短時間の遠心分離ステップで膜を乾燥させた。溶出バッファー( $10\text{mM}$  Tris-HCl) $200\mu\text{l}$ を添加し、短時間の遠心分離ステップ( $10,000\text{rpm}$ 、1分)で結合したDNAをフィルター膜から溶出した。

## 【0101】

2回の抽出過程により単離されたDNAを $10\mu\text{l}$ ずつ0.7% TAEアガロースゲルにロードし、エチジウムブロマイドで染色して分析した。抽出方法による、ゲノムDNAの収率、その完全性(低分子のスメアなバンドがみられない、不純物のない個々のバンド)および再現性を比較した。観察されるように、本発明の方法によって

、比較のための方法よりも優れた結果を得ることができる(図4)。

【0102】

実施例5 全血サンプル(5 $\mu$ l)からのDNAの抽出に関する、本発明の方法とカオトロピック塩存在下での核酸の結合に基づく市販のキットによる方法との比較

本発明の方法によるゲノムDNAの単離を、核酸を結合させるためにカオトロピック塩を用いるという市販品として入手可能でかつ従来から適応されている方法によるゲノムDNAの単離と比較した。比較のための方法では、ゲノムDNAは使用説明書に基づいて抽出した。

【0103】

本発明の方法によるDNAの単離は、以下のとおりである。

【0104】

全血サンプル(EDTAで処理したもの、新鮮血)5 $\mu$ lずつを1.5mlのエッペンドルフ管に移した。該サンプルに195 $\mu$ lの1 $\times$ PBSバッファーを添加して総量200 $\mu$ lとし、溶解バッファー(CTAB、ポリビニルピロリドン、塩化アンモニウム、Tris、EDTA)350 $\mu$ lとプロテイナーゼK(20mg/ml)20 $\mu$ lを添加し、10分間70℃でインキュベートし、出発材料を溶解させた。溶解後、界面活性剤/イソプロパノール混合液180 $\mu$ lを加え、サンプルを短時間振り混ぜ、続いて、市販の遠心分離用カラム(LIDA社、ガラス繊維膜)に載せ、12,000rpmで2分間遠心分離した。その後、洗浄バッファー(NaCl、Tris-HCl、EDTA、エタノール)で該カラムを2回洗浄し(12,000rpm、1分間遠心分離)、短時間の遠心分離ステップにより膜を乾燥させた。溶出バッファー(10mM Tris-HCl)200 $\mu$ lを添加し、短時間の遠心分離ステップ(10,000rpm、1分)で結合したDNAをフィルター膜から溶出した。

【0105】

2回の抽出過程により単離されたDNAを20 $\mu$ lずつ0.7% TAEアガロースゲルにロードし、エチジウムブロマイドで染色して分析した。抽出方法に対する、微量の出発材料からのゲノムDNAの単離能、および再現性を測定し比較した。観察されるように、本発明の方法によって、比較のための方法よりも優れた結果を得ることができる(図5)。

【0106】

実施例6 様々な種類の動物組織サンプルおよび様々な量の出発材料からの、本発明によるDNAの抽出と、カオトロピック塩存在下での核膜の結合に基づく市販のキットによる抽出との比較

本発明の方法によるゲノムDNAの単離を、核膜を結合させるためにカオトロピック塩を用いることによる市販品として入手可能で従来から適応されている方法によるゲノムDNAの単離と比較した。使用説明書に基づいて、比較のための方法によるゲノムDNAの抽出を行った。

【0107】

本発明の方法によるDNAの単離は、以下のとおりである。

【0108】

ブタ腎臓、ブタ心臓、およびブタ肝臓の組織サンプル5mgまたは20mgを、それぞれ、1.5mlのエッペンドルフ管に移した。溶解バッファー(CTAB、ポリビニルピロリドン、塩化アンモニウム、Tris、EDTA)400 $\mu$ lとプロテイナーゼK(20mg/ml)40 $\mu$ lを該サンプルに添加した。52℃でインキュベートすることにより、出発材料の溶解を実施した。溶解後、溶解されていない構成要素を短時間の遠心分離ステップ(14,000rpm、1分)で遠心沈降させ、上澄み液を界面活性剤/イソプロパノール混合液200 $\mu$ lの入った新しい反応容器に入れ、そのサンプルを短時間振り混ぜ、続いて市販の遠心分離用カラム(LIDA社、ガラス繊維膜)に移し、12,000rpmで2分間遠心分離した。その後、エタノールを含有する洗浄バッファー(NaCl、Tris-HCl、EDTA、エタノール)で該カラムを2回洗浄し(12,000rpm、1分間遠心分離)、短時間の遠心分離ステップにより膜を乾燥させた。溶出バッファー(10mM Tris-HCl)200 $\mu$ lを添加し、短時間の遠心分離ステップ(10,000rpm、1分)により結合したDNAをフィルター膜から溶出した。

【0109】

2回の抽出過程により単離されたDNAを10 $\mu$ lずつ0.7% TAEアガロースゲルにロードし、エチジウムブロマイドで染色して分析した。抽出法に対する、ゲノムDNAの収率、完全性(低分子のスメアなバンドがみられない、不純物のない個々のバンド)および再現性に関して、種々の組織サンプルおよび様々な量の出発材料からのゲノムDNAの単離能を測定し比較した。観察されるように、本発明の方法に

よって、比較のための方法よりも優れた結果を得ることができる(図6)。

#### 【0110】

実施例7 本発明の方法による、そしてカオトロピック塩との結合に使用する媒介物としての様々な担体への核酸の結合による、全血サンプル(200 $\mu$ l)からのDNAの抽出

本発明の方法による、そしてカオトロピック試薬を用いる核酸の単離に使用する様々な担体(カラムの膜および懸濁物)への核酸の結合による、全血200 $\mu$ lからのゲノムDNAの単離を示す。DNAの抽出は、LIDA社製のガラス繊維膜の代わりに種々の従来から使用されている種々の担体を用いて、実施例4に記載のとおり実施する。

#### 【0111】

単離されたDNAを20 $\mu$ lずつ0.7%TAEアガロースゲルにロードし、エチジウムブロマイドで染色して分析した。図7において観察されるように、本発明の方法により、従来から知られているカオトロピック塩を用いた方法に用いられる様々な担体への核酸の結合が起こる。

#### 【0112】

実施例8 タンパク質分解酵素を含む安定して保存できる溶解バッファー系(バッファー混合物1)の調製、および種々の出発材料からゲノムDNAを単離するための該溶解バッファー系の使用

3M塩化カリウム、2% CTAB、18.2mM Tris-HCl(pH 8.3)、12.5mM EDTA、2.8% ポリビニルピロリドンを含む溶解バッファー保存溶液を調製する。保存溶液を400 $\mu$ lずつ、1.5mlのエッペンドルフ管に分注し、プロテイナーゼK(20mg/ml)40 $\mu$ lを添加する。溶解バッファー混合物を凍結乾燥用設備(アルファ2; Christ社)内で凍結乾燥する。その後、溶解バッファー混合物を密閉した反応容器中で室温にて6ヶ月間保存する。

#### 【0113】

ゲノムDNAの抽出を：

A：全血500 $\mu$ l

B：唾液サンプル400 $\mu$ l

C: パラフィン包埋組織材料  
から実施した。

#### 【0114】

##### 1. 全血からのDNAの抽出

溶解バッファの固形製剤に全血500 $\mu$ lを添加し、70℃で10分間インキュベートする。イソプロパノール200 $\mu$ lを添加し、該懸濁液を遠心分離用カラム(ガラス繊維マット)に移す。最高回転数で2分間遠心し、遠心分離物を捨てる。洗浄バッファ(70%エタノール、NaCl、Tris、EDTA)600 $\mu$ lを加え、最高回転数で1分間遠心分離し、遠心分離物を捨てる。この洗浄ステップを繰り返す。続いて、最高回転数で2分間遠心分離して、膜を乾燥させる。溶出バッファ(70℃)200 $\mu$ lを加えて最高回転数で1分間遠心分離することにより、DNAを膜から溶出させる。

#### 【0115】

##### 2. 唾液サンプルからのDNAの抽出

溶解バッファの固形製剤に唾液サンプル500 $\mu$ lを添加し、70℃で10分間インキュベートする。イソプロパノール200 $\mu$ lを添加し、該懸濁液を遠心分離用カラム(ガラス繊維マット)に移す。最高回転数で2分間遠心し、遠心分離物を捨てる。洗浄バッファ(70%エタノール、NaCl、Tris、EDTA)600 $\mu$ lを加え、最高回転数で1分間遠心分離し、遠心分離物を捨てる。この洗浄ステップを繰り返す。続いて、最高回転数で2分間遠心分離して、膜を乾燥させる。

#### 【0116】

溶出バッファ(70℃)200 $\mu$ lを加えて最高回転数で1分間遠心分離することにより、膜からDNAを溶出する。

#### 【0117】

##### 3. パラフィン包埋組織からのDNAの抽出

溶解バッファの固形製剤にパラフィン包埋組織切片を加える。500 $\mu$ lの蒸留水(dd H<sub>2</sub>O)を加え、52℃で30分間インキュベートする。イソプロパノール200 $\mu$ lを添加し、該懸濁液を遠心分離用カラム(ガラス繊維マット)に移す。最高回転数で2分間遠心分離し、遠心分離物を捨てる。洗浄バッファ(70%エタノール、NaCl、Tris、EDTA)600 $\mu$ lを加え、最高回転数で1分間遠心分離し、遠心分離物を捨



てる。この洗浄ステップを繰り返す。続いて、最高回転数で2分間遠心して、膜を乾燥させる。溶出バッファー(70℃)200 $\mu$ lを加えて最高回転数で1分間遠心分離することにより、DNAを膜から溶出させる。

#### 【0118】

その後、抽出されたDNAをゲル電気泳動にて分析した。この目的のために、全DNA溶出物を1/10ずつアブライした(図8)。

#### 【0119】

実施例9 プロテイナーゼKを含む安定して保存できる溶解バッファー系(バッファー混合物2)の調製、および8つの別個の全血サンプル(100 $\mu$ l)からゲノムDNAを単離するための該溶解バッファー系の使用

3M 塩化アンモニウム、2% ポリビニルピロリドン、16.7 mM EDTA、60mM Tris-HCl、1.6% CTAB、プロテイナーゼK(20mg/ml)20 $\mu$ lを含有する溶解バッファー保存溶液を調製する。保存溶液を400 $\mu$ lずつ、1.5mlのエッペンドルフ管に分注し、該エッペンドルフ管を蓋を開けてサーモミキサー内で95℃にてインキュベートして、完全に乾燥させる。その後、該エッペンドルフ管の蓋を閉めて、室温にて12ヶ月間保存する。

#### 【0120】

##### 全血からのDNAの抽出

溶解バッファーの固形製剤に全血100 $\mu$ lを添加し、70℃で10分間インキュベートする。シリカに基づく無機質担体の懸濁液20 $\mu$ lを添加し、短時間混合する。該バッチを1分間インキュベートする。短時間の遠心分離にて該担体をベレットにし、担体のベレットを、800 $\mu$ lの洗浄バッファー(70%エタノール、NaCl、Tris、EDTA)で洗浄し、続いて、70℃でインキュベートすることにより残留するエタノールを除去する。70℃に加熱した溶出バッファー(10mM Tris-HCl、pH 8.69)200 $\mu$ lを加え、最高回転数で1分間遠心分離して担体から核膜を分離することにより、担体からDNAを溶出させ、核酸を新しい反応容器に移す。続いて、抽出したDNAをゲル電気泳動にて分析した。この目的のために、全DNA溶出物の1/10ずつをアブライした(図9)。

#### 【0121】

実施例10 微量試験用プレートの官能性表面への直接結合による、末梢血リンパ球からのゲノムDNAの単離

市販されているプレートをCOO<sup>-</sup>基でコートして、微量試験用プレートとして用いた。官能基を有する該プレートの1列(8ウェル)および陰性対照としてCOO<sup>-</sup>基を有しない1列をそれぞれ単離に用いた。

【0122】

全ウェルに、1×PBSバッファー中の末梢血リンパ球30 $\mu$ lを入れて、溶解バッファー(塩化アンモニウム、CTAB、ポリビニルピロリドン、Tris-HCl、EDTA、プロテイナーゼK)180 $\mu$ lを加えて、70℃で5分間インキュベートした。続いて、界面活性剤/イソプロパノール混合液80 $\mu$ lを添加した。該バッチを短時間振盪し、5分間インキュベートした。続いて、溶液をウェルから捨てた。そしてすぐに、エタノールを含有する洗浄バッファーでそれらのウェルを2回洗浄し、残留するエタノールを70℃で短時間インキュベートすることにより除去した。核酸の溶出は、10mM Tris-HCl 25 $\mu$ lを添加して2分間インキュベートすることにより実施した。

【0123】

そして直ちに、溶出物を0.7%アガロースゲル上で評価した(図10)。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、様々な植物材料から単離したゲノムDNAのアガロースゲル電気泳動の結果を示す。

【図2】

図2は、多様な出発材料から同時に単離したゲノムDNAのアガロースゲル電気泳動の結果を示す。

【図3】

図3は、口腔粘膜のスワップサンプルから単離したDNAのアガロースゲル電気泳動の結果を示す。

【図4】

図4は、全血サンプル(200 $\mu$ l)から、本発明により抽出したDNA、および、カ

オトロピック塩存在下での核酸の結合に基づく市販キットにより抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動の結果を示す。

【図5】

図5は、カオトロピック塩存在下での核酸の結合に基づいた市販キットにより全血サンプル( $5\mu\text{l}$ )から抽出したDNA、および、本発明により全血サンプル( $5\mu\text{l}$ )から抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動の結果を示す。

【図6】

図6は、各種および異なる量の動物組織サンプルから、本発明により抽出したDNA、および、カオトロピック塩存在下での核酸の結合に基づく市販キットにより抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動の結果を示す。

【図7】

図7は、本発明の方法により、およびカオトロピック塩との結合に使用する種々の担体への核酸の結合により、全血サンプル( $200\mu\text{l}$ )から抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動の結果を示す。

【図8】

図8は、バッファー混合物1を用いて、全血 $500\mu\text{l}$ 、唾液サンプル $400\mu\text{l}$ 、パラフィン包埋組織材料から抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動の結果を示す。

【図9】

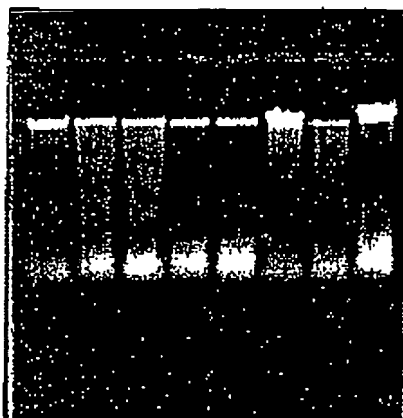
図9は、バッファー混合液2を用いて8つの別個の全血サンプル( $100\mu\text{l}$ )から単離したゲノムDNAのアガロースゲル電気泳動の結果を示す。

【図10】

図10は、微量試験用プレートの官能性表面への直接結合により単離した、末梢血リンパ球由来のゲノムDNAのアガロースゲル電気泳動の結果を示す。

【図1】

1 2 3 4 5 6 7 8

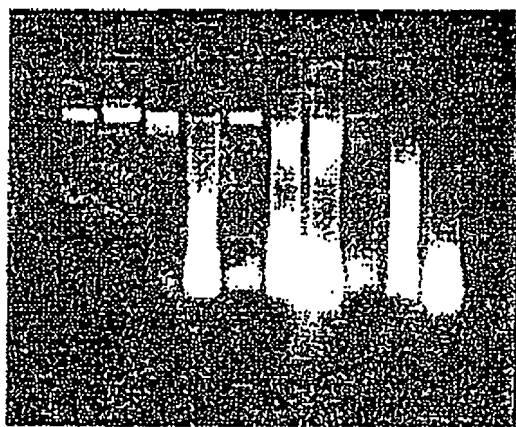


レーン:

- 1- タマネギ(生)
- 2- エゾネギ(生、緑色)
- 3- エゾネギ(生、緑色)
- 4- ゼラニウム(吊り下げ、花および葉、生)
- 5- ゼラニウム(立ち植え、葉、生)
- 6- イチイ(針葉、生)
- 7- キンボウケ科の草 (kouseiai grass) (生、葉、緑色)
- 8- ヨモギギク(生、緑色、葉)

【図2】

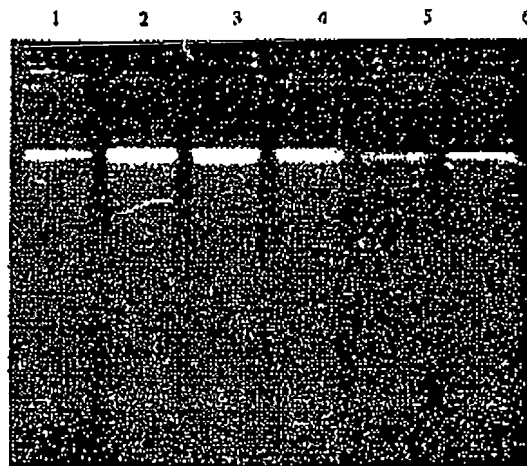
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



レーン:

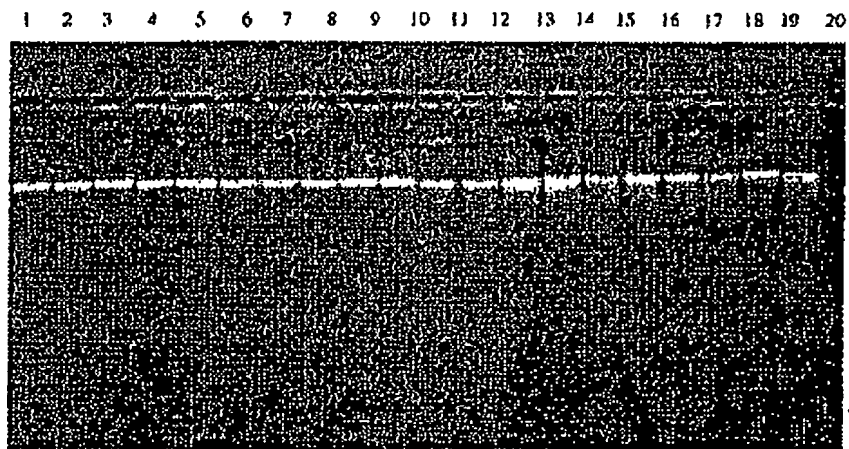
- 1- 全血液、凍結; 50 $\mu$ l
- 2- 全血液; 100 $\mu$ l
- 3- キュウリ; 50mg
- 4- トマト植物の葉; 100mg
- 5- 唾液サンプル; 100 $\mu$ l
- 6- ニワトリ肝臓、冷凍食品; 5mg
- 7- ニワトリ肝臓、冷凍食品; 20mg
- 8- 毛根
- 9- シチメンチョウサラム; 50mg
- 10- イチイ、針葉; 100mg

【図3】



レーン1～6：口唇粘膜のスワップサンプルからのDNA

【図4】

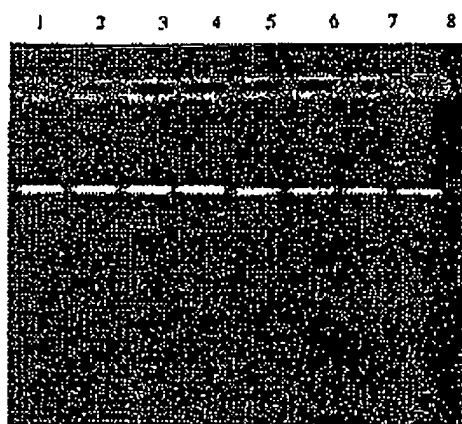


レーン：

1～10：本発明の抽出方法

11～20：比較のための方法

【図5】

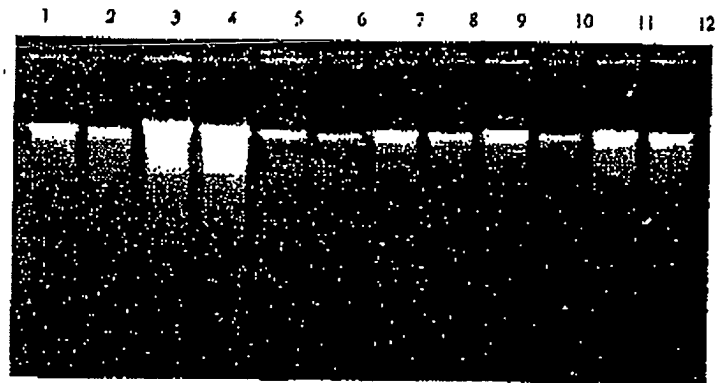


レーン:

1～4:本発明の抽出方法

5～8:比較のための方法

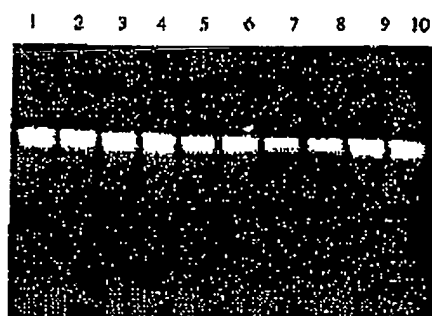
【図6】



レーン：

- 1－ 本発明の抽出方法；5mg 腎臓
- 2－ 比較のための方法；5mg 腎臓
- 3－ 本発明の抽出方法；20mg 腎臓
- 4－ 比較のための方法；20mg 腎臓
- 5－ 本発明の抽出方法；5mg 心臓
- 6－ 比較のための方法；5mg 心臓
- 7－ 本発明の抽出方法；20mg 心臓
- 8－ 比較のための方法；20mg 心臓
- 9－ 本発明の抽出方法；5mg 肝臓
- 10－ 比較のための方法；5mg 肝臓
- 11－ 本発明の抽出方法；20mg 肝臓
- 12－ 比較のための方法；20mg 肝臓

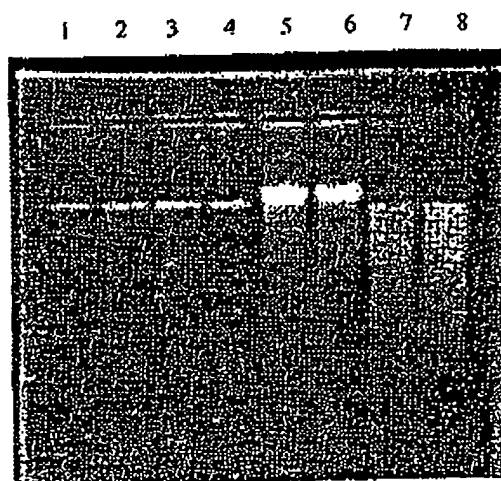
【図7】



レーン:

- 1/2- 膜、供給元A (市販の抽出用キット)
- 3/4- 膜、供給元B (市販の抽出用キット)
- 5/6- 膜、供給元C (市販の抽出用キット)
- 7/8- 酸化シリコンの担体懸濁液
- 9/10- 京産土の担体懸濁液
- 11/12- エアロゲイルの担体懸濁液 (200nm<sup>2</sup>/g)

【図8】

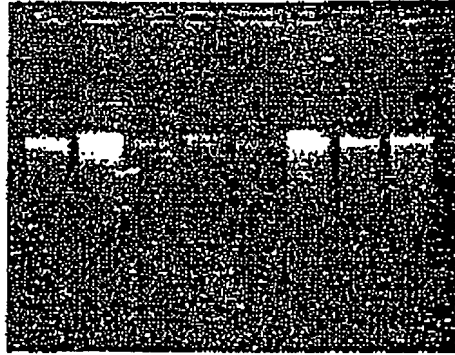


レーン:

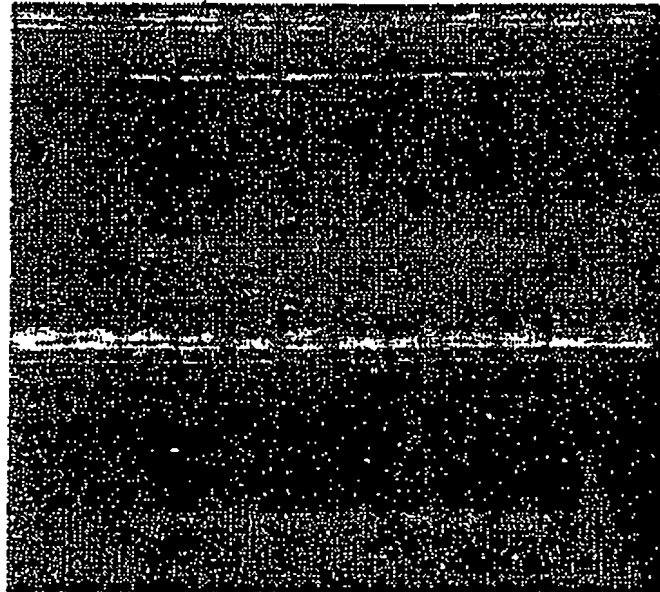
- 1~4: 唾液サンプルから抽出した DNA
- 5~6: 全血液から抽出した DNA
- 7~8: パラフィン包埋組織材料から抽出した DNA



【図9】



【図10】

CO<sub>2</sub>透過性試験用プレート

非透過性試験用プレート